

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Pesatnya pertumbuhan populasi manusia dan kemajuan teknologi telah menyebabkan meningkatnya permintaan energi, yang diproyeksikan akan meningkat sebesar 50% atau lebih pada tahun 2030. Minyak bumi alami tidak dapat mengompensasi laju konsumsi pada saat ini yang telah dilaporkan 105 kali lebih cepat daripada yang dapat disediakan oleh alam. Di sisi lain penggunaan sumber energi fosil juga telah disadari menyumbang emisi gas rumah kaca yang tidak hanya menyebabkan pemanasan global dengan segala permasalahan lain yang mengikutinya, akan tetapi juga mengakibatkan keasaman perairan yang berujung pada kerusakan lingkungan. Oleh sebab itu akhir-akhir ini penggunaan bioenergi menjadi primadona, karena bioenergi berasal dari tumbuhan sehingga dapat diperbaharui. Sumber bioenergi seperti bioetanol mudah didapatkan dari tumbuhan yang mengandung pati dan selulosa ^{1,2}.

Mikroalga merupakan salah satu mikroorganisme yang dinilai ideal dan potensial untuk dijadikan sebagai bahan baku biofuel. Berbagai penelitian telah dilakukan untuk memanfaatkan mikroalga sebagai bahan baku biofuel salah satunya yaitu pemanfaatan mikroalga sebagai sumber bioetanol, yang merupakan sumber energi yang dapat diperbaharui dan ramah lingkungan serta memiliki nilai oktan yang lebih tinggi daripada premium. Produksi bioetanol dari mikroalga membutuhkan bahan baku glukosa yang diperoleh dari hidrolisis karbohidrat dimana glukosa akan di fermentasi sehingga menghasilkan etanol ³.

Untuk menghasilkan bioetanol, diperlukan karbohidrat yang banyak dari mikroalga, hal ini berhubungan dengan biomassa yang dihasilkan dan sering kali menjadi kendala karena biomassa dihasilkan sangat kecil jumlahnya. Salah satu cara untuk meningkatkan biomassa mikroalga adalah dengan mengatur medium pertumbuhannya. Selain itu yang menjadi tantangan utama dalam produksi bioetanol dari mikroalga adalah bagaimana memecah gula kompleks menjadi gula sederhana/ glukosa. Glukosa diperoleh dengan cara hidrolisis asam yaitu

menggunakan asam sulfat (H_2SO_4) untuk mendapatkan kadar glukosa yang maksimum dilakukan optimasi hidrolisis yaitu dengan memvariasikan konsentrasi asam sulfat, suhu, dan waktu hidrolisis sehingga bisa didapatkan kondisi optimum untuk hidrolisis asam ².

Mikroalga dapat tumbuh pada medium sintetis dan juga medium alami seperti limbah cair tahu. Bolds Basal Medium (BBM) merupakan salah satu medium sintetis standar yang digunakan sebagai medium pertumbuhan mikroalga. Limbah cair tahu merupakan medium alami untuk pertumbuhan mikroalga yang mempunyai peluang sebagai medium alternatif untuk menumbuhkan mikroalga karena mengandung bahan anorganik seperti nitrogen, fosfor, kalsium, flour dan kalium. Dalam limbah cair tahu juga terdapat bahan organik seperti protein, karbohidrat, lemak. Bahan organik tersebut dapat terdegradasi dan teroksidasi menjadi bahan anorganik ⁴.

Berdasarkan penelitian Dianursanti (2014), penggunaan media limbah cair tahu dengan dosis 30% dapat meningkatkan biomassa dari mikroalga *Chlorella vulgaris* sebesar 10,71% dibanding media walne (standar) sehingga pada penelitian ini digunakan limbah cair tahu (LCT) dengan beberapa variasi konsentrasi yang diharapkan dapat meningkatkan biomassa dan karbohidrat mikroalga ⁵.

Mikroalga *Scenedesmus dimorphus* mempunyai potensi yang sangat baik sebagai sumber energi terbarukan karena kadar karbohidratnya yang tinggi dalam persen berat kering adalah 21-52%, ketersediaannya mudah diperoleh melalui kultur, tidak bersaing dengan bahan pangan, memiliki daya adaptasi yang cepat terhadap lingkungan kultur yang baru dan mampu merombak nutrisi yang terkandung dalam limbah cair tahu menjadi biomassa ⁶

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang dikemukakan, rumusan masalah penelitian ini adalah:

1. Apakah limbah cair tahu dapat meningkatkan produksi biomassa mikroalga *Scenedesmus dimorphus*?

2. Berapakah konsentrasi LCT yang dapat memberikan pertumbuhan optimum *Scenedesmus dimorphus*?
3. Bagaimana kondisi optimum hidrolisis untuk menghasilkan glukosa tertinggi pada mikroalga *Scenedesmus dimorphus*?

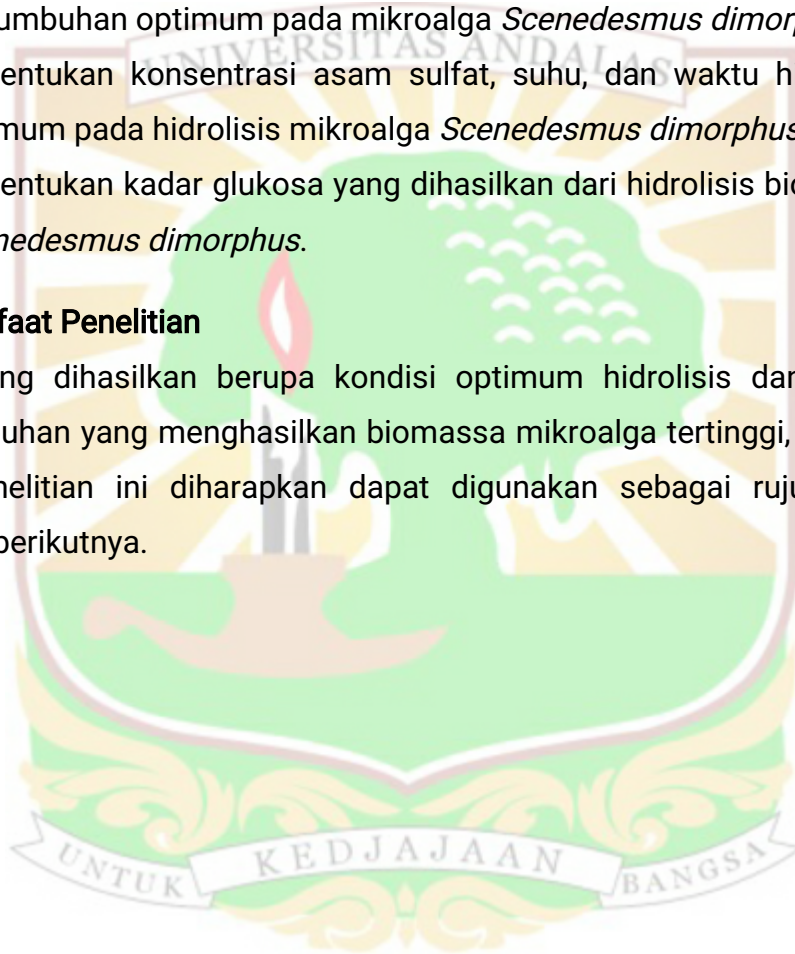
1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian yang akan dilakukan antara lain :

1. Menentukan konsentrasi limbah cair tahu yang memberikan pertumbuhan optimum pada mikroalga *Scenedesmus dimorphus*.
2. Menentukan konsentrasi asam sulfat, suhu, dan waktu hidrolisis optimum pada hidrolisis mikroalga *Scenedesmus dimorphus*.
3. Menentukan kadar glukosa yang dihasilkan dari hidrolisis biomassa *Scenedesmus dimorphus*.

1.4 Manfaat Penelitian

Data yang dihasilkan berupa kondisi optimum hidrolisis dan medium pertumbuhan yang menghasilkan biomassa mikroalga tertinggi, sehingga dari penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai rujukan oleh peneliti berikutnya.



BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mikroalga

Alga adalah organisme dengan struktur yang sederhana tidak memiliki akar, batang, atau daun. Mikroalga pada umumnya merupakan tumbuhan renik berukuran mikroskopik (diameter antara 3-30 μm) yang termasuk dalam kelas alga dan hidup sebagai koloni maupun sel tunggal di seluruh perairan tawar maupun laut. Morfologi mikroalga berbentuk uniseluler atau multiseluler tetapi belum ada pembagian fungsi organ yang jelas pada sel-sel komponennya⁷.

Biomassa mikroalga mengandung senyawa metabolit primer dan metabolit sekunder seperti karbohidrat, protein, lemak, asam nukleat, pigmen (klorofil dan karotenoid), lipoprotein, lutein dan senyawa bioaktif lain yang diproduksi pada fase tertentu. Pertumbuhan mikroalga dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu medium pertumbuhan, pH, pencahayaan, pengkulturan, dan kontaminasi dimana pertumbuhan mikroalga dapat dilihat dengan mengukur *Optical Density* (OD) dari mikroalga tersebut. Pertumbuhan mikroalga dibagi menjadi 5 fase yaitu fase lag, fase logaritmik atau eksponensial, fase penurunan laju pertumbuhan, fase stasioner, dan fase kematian^{8,9}.

1. Fase Lag

Fase ini disebut juga fase adaptasi karena mikroalga menyesuaikan diri dengan medium pertumbuhannya. Fase lag ditandai dengan ukuran sel yang umumnya meningkat sesaat setelah diinokulasikan kedalam medium. Organisme mengalami metabolisme namun belum terjadi pembelahan sel sehingga kepadatan sel belum meningkat dan populasi tidak mengalami perubahan.

2. Fase eksponensial

Fase eksponensial ditandai dengan terjadinya pertumbuhan yang cepat dan terjadi pembelahan sel secara konstan yang ditandai dengan naiknya laju pertumbuhan. Sel-selnya aktif berkembang biak dan komponen metabolit primernya mulai terbentuk. Keadaan pertumbuhan

ini seimbang dengan *supply* makanan yang ada.

3. Fase penurunan laju pertumbuhan

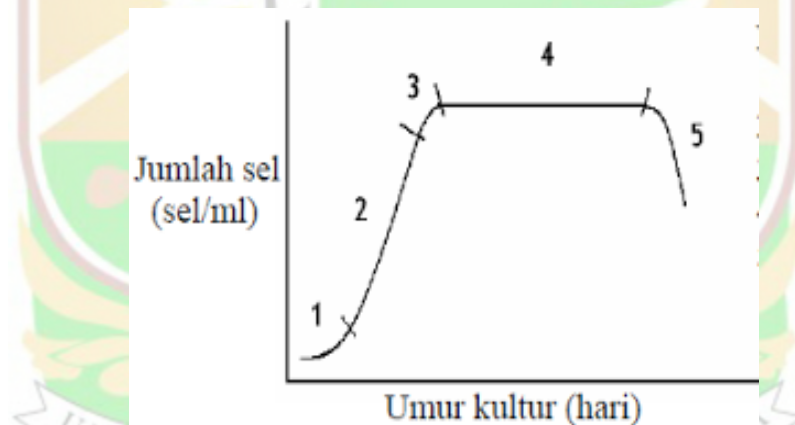
Pada fase ini penambahan jumlah individu mulai berkurang, hal ini disebabkan karena sumber nutrisi yang terkandung didalam medium pertumbuhan sudah sedikit.

4. Fase stasioner

Fase stasioner ditandai dengan pertumbuhan dengan laju yang sangat lambat, terjadi akumulasi racun akibat metabolisme mikroalga, kekurangan nutrisi dan perubahan kondisi lingkungan dimana terjadi perombakan metabolit primer menjadi metabolit sekunder, sehingga mikroalga mengandalkan metabolit sekunder untuk tumbuh. Fase ini ditandai dengan garis yang mendatar pada kurva.

5. Fase kematian

Pada fase ini mikroalga sudah tidak mampu lagi bertahan hidup karena kehabisan sumber nutrisi, sehingga kepadatan sel berkurang⁹.



Gambar 2.1 Kurva Pertumbuhan Mikroalga

Mikroalga mempunyai laju pertumbuhan yang tinggi dan dapat hidup dalam berbagai kondisi lingkungan, tidak memerlukan lahan yang luas untuk pertumbuhannya serta tidak bersaing dengan bahan pangan makhluk hidup apabila dimanfaatkan sebagai bahan non pangan seperti sebagai bahan bakar. Mikroalga mengandung karbohidrat yang besar yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku untuk penghasil bioetanol. Mikroalga seperti *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus*,

dan *Spirulina* mengandung sejumlah besar (>50% g/g) pati dan glikogen yang berguna sebagai bahan baku pembuatan etanol¹⁰.

Salah satu mikroalga yang memiliki kandungan karbohidrat yang tinggi adalah *Scenedesmus dimorphus* dengan klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae*

Divisi : *Cyanophyta*

Kelas : *Cyanophyceae*

Ordo : *Chlorococcale*

Famili : *Scenedesmaceae*

Genus : *Scenedesmus*

Spesies: *Scenedesmus dimorphus*



Gambar 2.2 *Scenedesmus dimorphus*¹¹
Sumber : algaeBASE.org

Scenedesmus dimorphus termasuk pada alga hijau (*Chlorophyta*). Sel *Scenedesmus dimorphus* memiliki jumlah sel berkelipatan 2, berkelompok membentuk koloni yang terdiri dari 4 sampai 32 sel. Diameter sel sekitar 1 - 2 µm dan panjangnya sekitar 40 µm dengan bentuk silinder yang meruncing disetiap ujungnya dengan sel terluar berbentuk seperti bulan sabit. *Scenedesmus dimorphus* memiliki kandungan karbohidrat yang cukup tinggi jika dibandingkan dengan beberapa jenis mikroalga lainnya dengan kadar karbohidrat 21-52%¹². Berikut ditampilkan beberapa jenis mikroalga beserta kandungan karbohidratnya masing-masing.

Tabel 2.1 Kandungan karbohidrat mikroalga

Spesies	Kandungan Karbohidrat (% Berat Kering)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	10-17
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	21-52
<i>Chlorella vulgaris</i>	12-17
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	26
<i>Spirogyra sp.</i>	33-64
<i>Spirulina platensis</i>	8-14

Sumber : Becker (2012)⁹

2.2 Nutrisi untuk Pertumbuhan Mikroalga

Biomassa mikroalga mengandung karbohidrat, lipid, protein, dan asam nukleat dengan kadar yang berbeda-beda tergantung spesiesnya masing-masing. Pertumbuhan mikroalga dipengaruhi oleh unsur hara atau nutrisi yang ada didalam medium pertumbuhannya serta kondisi lingkungan pada kultur mikroalga tersebut. Unsur hara yang dibutuhkan mikroalga terdiri dari unsur makro (N, P, K, S, Fe, Mg, Si, dan Ca) dan unsur mikro (Mn, Zn, Co, Bo, B, Cu, dll). Unsur N, P, dan S penting untuk pembentukan protein, sumber N yang biasa digunakan yaitu NaNO_3 dan NH_4Cl . Fosfor merupakan bahan dasar pembentuk asam nukleat, enzim, dan vitamin. Unsur K berfungsi sebagai metabolisme karbohidrat dan sebagai kofaktor beberapa koenzim. Unsur Fe berfungsi sebagai pembentuk klorofil yang dapat diperoleh dari FeCl_3 atau FeSO_4 sedangkan unsur Si dan Ca merupakan bahan pembentukan dinding sel dan cangkang¹³.

Unsur hara mikro seperti Mn dan Zn diperlukan untuk fotosintesis, unsur Mo, Bo, Co diperlukan untuk metabolisme nitrogen sedangkan unsur Mn, B, Cu untuk fungsi metabolik lainnya. Unsur hara mikro diperlukan

dalam jumlah yang sedikit dan distabilkan dengan EDTA ¹⁴.

Pada industri komersial panen biomassa yang terbaik dapat dicapai antara 0,3-0,5 g sel kering/L atau 5 g sel kering/L. Hal ini membuktikan bahwa menghasilkan biomassa mikroalga dalam jumlah besar sangat sulit, sehingga diperlukan upaya yang dapat meningkatkan produksi biomassa mikroalga. Upaya untuk meningkatkan produksi biomassa dapat dilakukan dengan memanipulasi faktor lingkungan seperti cahaya, kadar CO₂, suhu, pH, salinitas, bentuk wadah kultur, dan medium. Medium kultur merupakan salah satu faktor yang penting untuk pemanfaatan mikroalga. Perbanyakan biomassa *Scenedesmus* dapat dilakukan dengan menggunakan teknik kultur. Kultur mikroalga membutuhkan optimasi berbagai faktor pendukung hidup untuk memperoleh biomassa yang tinggi. Keberhasilan teknik kultur bergantung pada kesesuaian antara jenis mikroalga yang dibudidayakan dan beberapa faktor lingkungan ¹⁴.

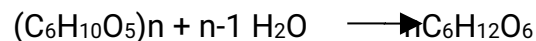
Komposisi nutrisi yang lengkap dan konsentrasi nutrisi yang tepat menentukan produksi biomassa dan kandungan gizi mikroalga. Medium yang umum digunakan untuk kultur mikroalga adalah medium sintetik dan alami. Medium sintetik terdiri dari senyawa-senyawa kimia yang komposisi dan jumlahnya telah ditentukan. Medium BBM merupakan salah satu medium sintetik yang umum digunakan untuk kultur mikroalga *Chlorophyta*. Sedangkan medium alami dapat diperoleh dari bahan alami seperti air kelapa dan limbah pembuatan produk tertentu seperti limbah pengolahan produk kacang kedelai, limbah minuman teh, limbah cair tahu, limbah tapioka dll ¹⁵.

Upaya meningkatkan biomassa dan kandungan karbohidrat pada mikroalga dapat dicapai dengan melakukan variasi nutrisi pada medium pertumbuhan mikroalga. Limbah cair tahu adalah salah satu limbah yang dapat digunakan sebagai medium pertumbuhan mikroalga. Limbah cair tahu dihasilkan dari proses pembuatan tahu maupun dari pencucian kedelai ⁵. Limbah cair tahu mengandung posfor, nitrogen, ammonia, dan karbon yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroalga. Limbah cair tahu juga mengandung bahan-bahan organik kompleks yang tinggi terutama

protein dan asam-asam amino dalam bentuk padatan tersuspensi maupun terlarut. Adanya senyawa-senyawa organik tersebut menyebabkan limbah cair industri tahu mengandung BOD, COD dan TSS yang tinggi, apabila dibuang kedalam perairan tanpa pengolahan terlebih dahulu dapat menyebabkan pencemaran perairan. Salah satu upaya untuk memanfaatkan limbah cair tahu adalah dengan menggunakan limbah tersebut sebagai medium pertumbuhan mikroalga *Scenedesmus dimorphus*^{5,15}.

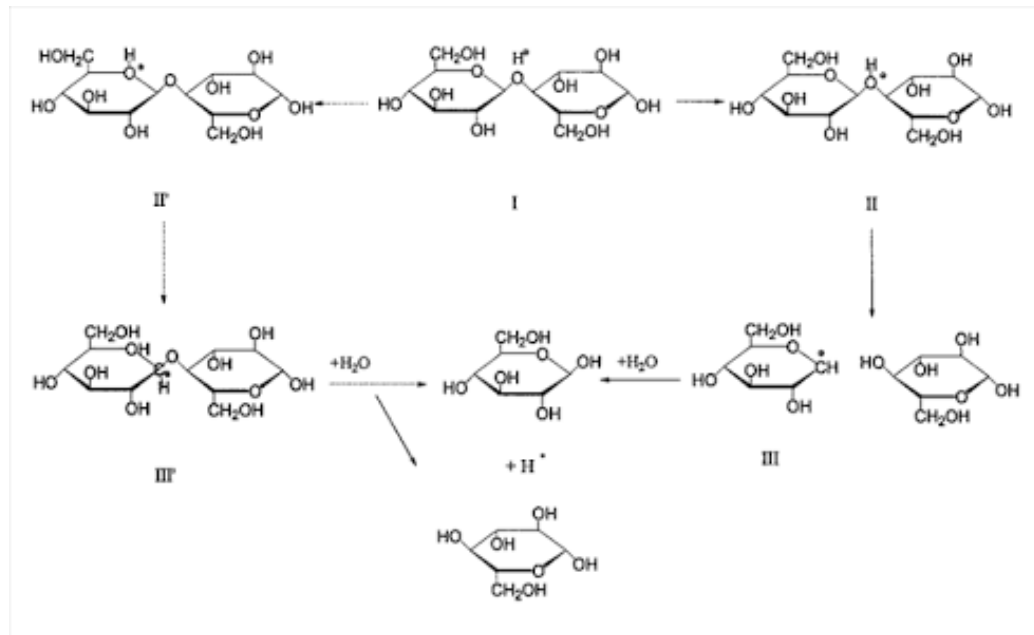
2.4 Hidrolisis Selulosa Menjadi Glukosa

Hidrolisis adalah reaksi kimia yang memecah molekul air (H_2O) menjadi kation hidrogen (H^+) dan anion hidroksida (OH^-) melalui suatu proses kimia. Hidrolisis pati merupakan proses pemecahan molekul amilum menjadi bagian-bagian penyusunnya yang lebih sederhana seperti dekstrin, isomaltosa, maltosa, dan glukosa. Prinsip dasar hidrolisis adalah untuk memotong ikatan α -1,4 glukosida dan ikatan α -1,6 glukosida dari amilopektin sehingga menghasilkan pati dalam ukuran yang lebih sederhana (glukosa). Secara umum reaksi hidrolisis dapat dituliskan sebagai berikut:



Hidrolisis selulosa dapat dilakukan secara enzimatis dan kimiawi. Hidrolisis secara enzimatis dilakukan dengan menggunakan enzim selulase, sedangkan hidrolisis secara kimiawi dapat dilakukan dengan menggunakan asam dan basa. Asam yang umumnya digunakan adalah asam sulfat atau asam klorida¹⁶. Penambahan asam dalam proses hidrolisis adalah sebagai katalis untuk mempercepat pemutusan rantai polisakarida menjadi glukosa karena hidrolisis alami menggunakan air berlangsung lambat dan sangat lama. Hidrolisis selulosa secara asam dapat dilakukan dengan menggunakan asam kuat encer pada temperatur dan tekanan yang tinggi atau dengan menggunakan asam pekat pada temperatur dan tekanan rendah. Proses hidrolisis pada suhu tinggi dilakukan pada kisaran suhu 160-240°C, sedangkan proses hidrolisis pada suhu rendah dilakukan pada suhu 80-140°C¹⁷.

Mekanisme reaksi hidrolisis dengan katalis asam dapat ditunjukkan seperti gambar berikut:



Gambar 2.3 Proses hidrolisis ikatan glikosidik dengan katalis asam¹⁷

Hidrolisis dalam suasana asam menghasilkan pemecahan ikatan glikosida dan berlangsung dalam tiga tahap. Tahap pertama proton yang bertindak sebagai katalisator asam akan berinteraksi secara cepat dengan oksigen glikosida yang menghubungkan dua unit gula (I) sehingga membentuk asam konjugasi (II). Langkah ini akan diikuti dengan pemutusan ikatan C-O, dalam kebanyakan hal menghasilkan zat antara kation karbonium siklis (III). Protonasi juga dapat terjadi pada oksigen cincin (II'), menghasilkan pembukaan cincin dan kation karbonium non siklis (III'). Keberadaan air pada sistem akan menyebabkan OH^- dari air berikatan dengan ion karbonium sehingga membebaskan gula dan proton, proton yang terbentuk akan berinteraksi secara cepat dengan ikatan glikosidik oksigen pada dua unit gula yang lain. Proses tersebut berlangsung secara kontinyu sampai semua molekul selulosa terhidrolisis

menjadi glukosa^{16,17}.

Menurut Be Miller dan Whistler hidrolisis asam menghasilkan proses yang lebih murah tapi produk yang dihasilkan tidak sebaik pada hidrolisis enzimatis yang memakan biaya yang jauh lebih mahal. Namun pada hidrolisis asam dan basa, proses hidrolisis dapat berlangsung beberapa menit saja sedangkan proses hidrolisis enzimatis memerlukan waktu beberapa hari¹⁸. Hidrolisis basa biasanya digunakan untuk bahan yang terdapat lignin pada dinding selnya sedangkan mikroalga tidak memiliki lignin pada dinding selnya. Hidrolisis dengan menggunakan basa pekat atau encer menghasilkan kadar glukosa yang rendah disebabkan basa mendegradasi gula secara ekstrim¹⁹.

2.5 Metode Nelson-Somogy

Metode Nelson-Somogy merupakan metode kimiawi yang dapat digunakan untuk analisis karbohidrat dengan menggunakan metode oksidasi. Metode ini didasari dengan tereduksinya kupri oksida menjadi kupro oksida karena adanya kandungan gula reduksi dalam sampel. Pada metode ini digunakan pereaksi fosfomolibdat sebagai pengompleks. Reagen Nelson-Somogy berfungsi sebagai oksidator antara kupri oksida yang bereaksi dengan gula reduksi membentuk endapan merah bata. Dengan membandingkan terhadap larutan standar, konsentrasi gula dalam sampel dapat ditentukan. Reaksi dengan pengompleks fosfomolibdat menghasilkan warna biru, dapat menentukan konsentrasi gula dalam sampel dengan mengukur absorbansinya²⁰.

2.6 Pembentukan Etanol dari Glukosa

Glukosa didapatkan melalui proses hidrolisis asam yang selanjutnya difermentasi untuk mendapatkan etanol. Fermentasi adalah suatu proses perubahan kimia yang disebabkan oleh aktivitas mikroba ataupun oleh aktivitas enzim yang dihasilkan mikroba. Jalur metabolisme karbohidrat yang pernah diselidiki adalah pada sistem fermentasi etanol oleh khamir. Salah satu jenis khamir yang produktif dan sering digunakan ialah *Saccharomyces cerevisiae*. Dalam fermentasi ini glukosa didegradasi

menjadi etanol dan CO₂ melalui suatu jalur metabolisme yang disebut glikolisis. Jalur glikolisis disebut juga sebagai jalur Embden-Meyerhof-Parnas²¹.

BAB III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan pada bulan Juni 2018 hingga bulan Januari 2019 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang. Limbah cair tahu didapatkan dari Pabrik Tahu STB, Parak Karakah Padang. Pengamatan morfologi mikroalga dengan mikroskop *fluorescent* dilakukan di Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Peternakan, Universitas Andalas.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: perlengkapan kultivasi (aerator, selang akuarium, botol kaca 500 mL, karet, plastik). Peralatan gelas (erlenmeyer, gelas ukur, labu ukur, batang pengaduk, tabung reaksi, pipet tetes). Botol vial, Spektrofotometer UV-Vis *Thermo Scientific Genesys 20*, H-C-12 *Centrifuge*, oven, *autoclave*, freezer, mikroskop *fluorescent*, *hotplate*, magnetik bar, neraca analitis, aluminium foil, plastik wrap.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu isolat mikroalga *Scenedesmus dimorphus*, NaNO₃ (Merck), CaCl₂.2H₂O (Merck), MgSO₄.7H₂O (Merck), K₂HPO₄ (Merck), KH₂PO₄ (Merck), NaCl (Merck), EDTA (Merck), KOH (Merck), FeSO₄.7H₂O (Merck), H₂SO₄ (Smart Lab), H₃BO₃, ZnSO₄.7H₂O (Merck), MnCl₂.4H₂O (Merck), MoO₃ (Merck), Co(NO₃)₂.6H₂O (Merck), CuSO₄.5H₂O (Merck), limbah cair tahu, reagen Nelson Somogy.

3.3 Pembuatan Reagen dan Medium

3.3.1. Reagen Nelson

Reagen Nelson terdiri dari 25 bagian Nelson A dan 1 bagian Nelson B. Nelson A dibuat dengan melarutkan Na_2CO_3 (Merck) sebanyak 6,25 g, K-Na-Tartrat (Merck) 6,25 g, Na_2SO_4 anhidrat (Merck) 50 g, NaHCO_3 (Merck) 5 g kedalam 250 mL akuades. Nelson B dibuat dengan melarutkan 7,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck) dalam 50 mL akuades, ditambahkan dengan 1-2 tetes H_2SO_4 p.a (Smart Lab).

3.3.2 Reagen Fosfomolibdat

Sebanyak 17,5 g asam molibdat (Merck) dan 2,5 g natrium tungstat (Merck) ditimbang dan dimasukkan kedalam gelas piala, dilarutkan dengan 175 mL NaOH (Merck) 5% kemudian dipanaskan lebih kurang selama 20-30 menit untuk menghilangkan ammonia. Setelah dingin ditambahkan dengan 75 mL H_3PO_4 85% diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 250 mL.

3.3.3 Pembuatan Medium BBM

Stok BBM dibuat dengan menimbang NaNO_3 (Merck), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), K_2HPO_4 (Merck), KH_2PO_4 (Merck), NaCl (Merck), EDTA (Merck), *trace element*, H_3BO_3 (Merck) sesuai dengan komposisi pada lampiran 2 kemudian masing-masing dilarutkan dengan akuades 1L. Medium BBM dibuat dengan mencampurkan masing-masing stok BBM sebanyak 10 mL untuk makronutrien dan 1 mL untuk mikronutrien kemudian larutan BBM disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit selanjutnya didinginkan hingga suhu ruang sebelum digunakan.

3.4 Prosedur Kerja

Penelitian ini dilakukan secara bertahap. Pada tahap pertama dilakukan pembuatan medium pertumbuhan mikroalga *Scenedesmus dimorphus* yaitu medium BBM dan medium BBM yang dikombinasikan dengan limbah cair tahu. Tahap kedua adalah kultivasi *Scenedesmus dimorphus* pada beberapa variasi medium dan pengukuran kurva pertumbuhannya. Tahap ketiga dilakukan perbanyakan kultur mikroalga dan pemanenan *Scenedesmus dimorphus*, dilanjutkan dengan pengeringan biomassa

untuk memperoleh biomassa kering. Tahap keempat dilakukan hidrolisis mikroalga dengan memberikan beberapa perlakuan yaitu variasi konsentrasi asam sulfat, variasi waktu hidrolisis dan suhu hidrolisis untuk mendapatkan kondisi optimum hidrolisis yaitu kondisi yang menghasilkan kadar glukosa paling tinggi. Skema kerja dapat dilihat pada lampiran 1.

3.4.1 Persiapan Limbah Cair Tahu.

Limbah cair tahu disaring dengan kain untuk menghilangkan serbuk-serbuk pengotor yang terdapat di dalamnya, kemudian dilakukan sterilisasi limbah cair tahu dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Sebelum digunakan limbah cair tahu steril disimpan didalam lemari pendingin.

3.4.2 Medium Pertumbuhan *Scenedesmus dimorphus*

Kultivasi *Scenedesmus dimorphus* dilakukan dalam 4 medium yang terdiri dari medium A, B, C, D. Pembuatan medium kombinasi (BBM + LCT) dengan mencampurkan keduanya kedalam botol 500 mL. Komposisi masing-masing medium sebagai berikut:

- Medium A: BBM 100%
- Medium B: medium BBM + LCT 1,5%
- Medium C: medium BBM + LCT 2,5 %
- Medium D: medium BBM + LCT 3 %

Komposisi masing-masing medium yang dikombinasikan dapat dilihat pada lampiran 3.

3.4.3 Pengamatan Morfologi Sel Mikroalga *Scenedesmus dimorphus*

Kultur awal mikroalga didapatkan dari hasil isolasi Reni Rahmayuni di Laboratorium Biolimia Universitas Andalas. Diambil kultur mikroalga dengan mikropipet, ditetaskan keatas kaca preparat dan ditutup dengan *deck* gelas kemudian diamati morfologi mikroalga *Scenedesmus dimorphus* dengan menggunakan mikroskop *flourescent* pada perbesaan 1000 X.

3.4.4 Kultivasi Mikroalga *Scenedesmus dimorphus*

Biakan *Scenedesmus dimorphus* dimasukkan kedalam medium pertumbuhan dengan perbandingan biakan dan medium yaitu 1 : 10 dalam

botol kaca 300 mL, masing-masing kultur dihubungkan dengan aerator pada kondisi yang sama. Dilakukan pengukuran absorban kultur setiap satu kali dalam dua hari menggunakan spektrofotometer UV Vis *Genesys 20* pada panjang gelombang 400 nm, nilai OD yang diperoleh dicatat dan diplotkan ke dalam kurva pertumbuhan mikroalga. Setelah didapatkan kurva pertumbuhan selanjutnya dilakukan perbanyakan biakan pada medium yang menghasilkan kurva pertumbuhan tertinggi dan biakan dipanen pada fasa eksponensial yang dapat dilihat pada kurva pertumbuhan, dipanen dengan metode sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Biomassa yang didapat dipisahkan kedalam cawan petri kemudian dikering anginkan untuk mendapatkan biomassa kering.

3.4.5 Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Larutan standar glukosa dibuat dengan variasi konsentrasi 20 mg/L, 40 mg/L, 60 mg/L, 80 mg/L, 100 mg/L, 120 mg/L, 140 mg/L, 160 mg/L, 180 mg/L, 200 mg/L dari larutan induk 1000 mg/L (Lampiran 5). Masing-masing larutan dipipet sebanyak 1 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan 1 mL reagen Nelson, dipanaskan selama 20 menit dalam air mendidih setelah itu di dinginkan sampai mencapai suhu ruang selanjutnya ditambahkan 1 mL reagen fosfomolibdat dan 7 mL akuades lalu diukur absorbannya pada panjang gelombang 540 nm.

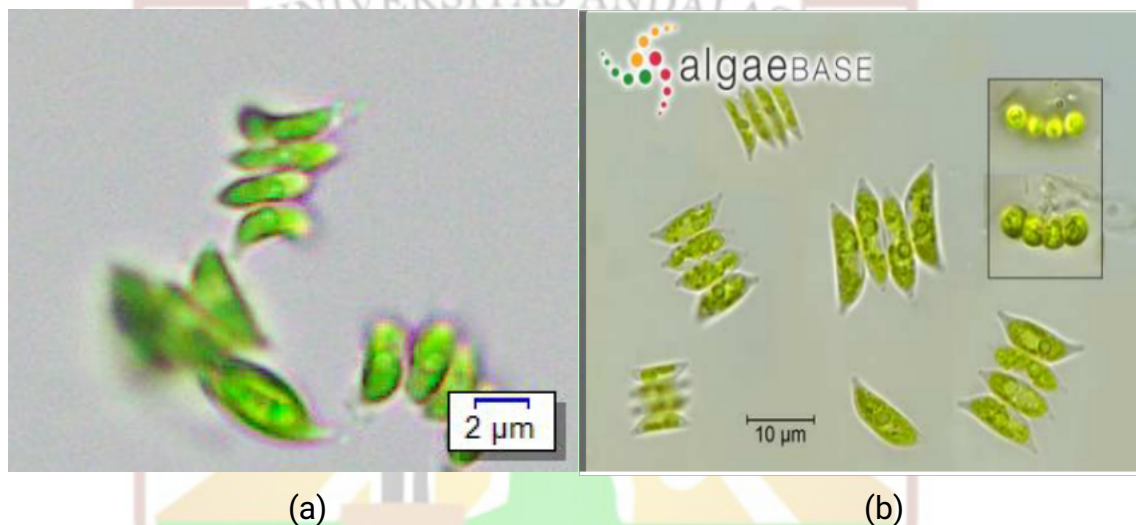
3.4.6 Hidrolisis Selulosa Menjadi Glukosa

Biomassa kering mikroalga ditimbang sebanyak 0,1 g dimasukkan kedalam 6 botol vial, masing-masing botol ditambahkan 10 mL H_2SO_4 dengan variasi konsentrasi 1N, 2N, 3N, 4N, 5N, dan 6N, hidrolisat yang didapatkan diukur kadar glukosanya dengan metode Nelson Somogy. Selanjutnya dilakukan hidrolisis dengan asam sulfat yang menghasilkan kadar glukosa paling tinggi dengan memberikan perlakuan variasi suhu hidrolisis yaitu 90°C, 100°C, 110°C, 110°C, kadar glukosa diukur dan yang menghasilkan kadar glukosa tertinggi selanjutnya digunakan untuk hidrolisis dengan memvariasikan waktu hidrolisis yaitu 5 menit, 10 menit, dan 15 menit dan diukur kadar glukosa hidrolisatnya. Semua perlakuan

yang menghasilkan kadar glukosa tertinggi merupakan kondisi optimum hidrolisis yang digunakan untuk mengukur kadar glukosa sampel. Kadar glukosa yang didapatkan dapat dilihat pada lampiran 7.

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Morfologi Mikroalga *Scenedesmus dimorphus*



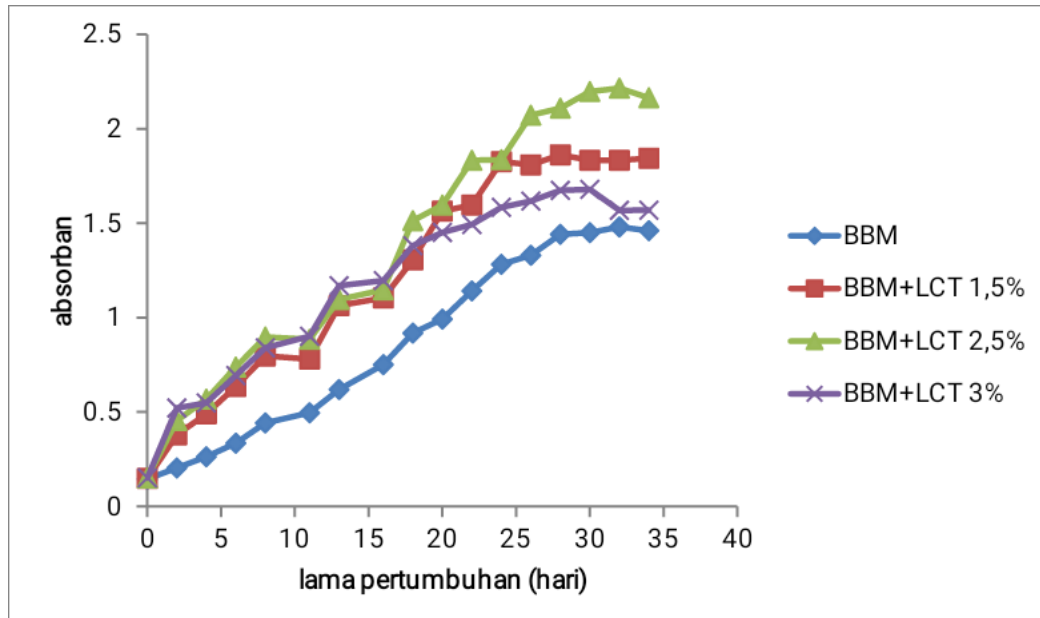
Gambar 4.1 a. Morfologi mikroalga *Scenedesmus dimorphus* hasil kultur
b. Morfologi mikroalga *Scenedesmus dimorphus*¹¹
Sumber: algaeBASE.org

Pengamatan morfologi mikroalga dilakukan untuk memastikan bahwa mikroalga yang akan dikultur tidak terkontaminasi dan merupakan spesies yang diinginkan. Sel *Scenedesmus dimorphus* memiliki jumlah sel berkelipatan 2, berbentuk silinder yang meruncing disetiap ujungnya dengan sel terluar seperti bulan sabit¹². Dari gambar a dapat dilihat bahwa sel mikroalga yang didapatkan memiliki ciri-ciri seperti yang dijelaskan diatas dan sama dengan gambar b yang bersumber dari website algaeBASE.org

4.2 Pertumbuhan Mikroalga pada Medium BBM yang Dikombinasikan dengan Limbah Cair Tahu

Pertumbuhan mikroalga diamati setiap satu kali dalam dua hari dengan mengukur OD nya pada panjang gelombang 400 nm, yang merupakan

panjang gelombang yang menghasilkan OD maksimum kultur mikroalga, dapat dilihat pada lampiran 9. Semakin tinggi nilai OD, menunjukkan semakin padat pertumbuhan sel, secara kasat mata ditunjukkan dengan bertambah pekatnya warna kultur. Kurva pertumbuhan *S. dimorphus* dengan beberapa perlakuan disajikan pada gambar kurva 4.2



Gambar 4.2 Kurva pertumbuhan mikroalga *Scenedesmus dimorphus*

Dari gambar 4.2 dinyatakan bahwa penambahan limbah cair tahu konsentrasi 1,5%, 2,5%, 3% dapat meningkatkan absorban medium yang menunjukkan meningkatnya pertumbuhan mikroalga *Scenedesmus dimorphus* dibanding kan dengan BBM. Pada semua perlakuan penambahan LCT, fase lag (adaptasi) tidak terlalu tampak karena jumlah pertumbuhan biomassa langsung meningkat setelah hari ke-2. Hal ini dapat terjadi karena fase lag berlangsung singkat sehingga tidak dapat diamati. Hal ini membuktikan bahwa sel *Scenedesmus* yang diinokulasikan kedalam medium limbah cair tahu mampu beradaptasi dengan lingkungan yang baru sehingga mampu membelah sel dengan cepat. Fase lag bergantung pada jumlah dan umur inokulum serta substrat yang digunakan sebagai medium²².

Kandungan limbah cair tahu yang dihasilkan industri tahu antara lain kalsium, fosfor, nitrogen, karbon dan besi. Masing-masing unsur

tersebut mempunyai fungsi khusus, unsur kalsium dan posfor penting untuk metabolisme karbohidrat dan pembentukan protein. Unsur besi penting bagi pembentukan pigmen fotosintesis yaitu klorofil. Peningkatan produksi biomassa menunjukkan tingkat efektifitas pertumbuhan mikroalga pada masing-masing perlakuan, dimana ini dipengaruhi oleh unsur-unsur yang terdapat pada limbah cair tahu yang sangat dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroalga *Scenedesmus dimorphus*²³. Nilai absorban untuk masing-masing medium dapat dilihat pada lampiran 4.

Produksi biomassa sangat dipengaruhi oleh kandungan nutrisi dalam medium. Hal ini dapat dilihat dari meningkatnya nilai absorban dari medium yang ditambahkan limbah cair tahu dibandingkan dengan medium kontrol yaitu BBM (Bold Bassal Medium) tanpa perlakuan. Kepadatan sel tertinggi didapatkan pada medium BBM + LCT 2,5%, ini disebabkan karena tersedianya nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan limbah cair tahu dalam jumlah yang cukup seperti nitrogen, dimana nitrogen merupakan bahan penting untuk pembelahan sel. Faktor lain yang mempengaruhi kepadatan sel mikroalga adalah kandungan ammonia yang tinggi pada LCT, ammonia terionisasi sehingga menghasilkan ammonium (NH_4^+) yang merupakan sumber nutrisi bagi mikroalga.

Pada penambahan LCT 3% terjadi penurunan kepadatan sel, sesuai penelitian Dianursanti et al,(2014) bahwa konsentrasi NH_3 dalam medium yang melebihi batas maksimum akan menghambat pertumbuhan sel sehingga terjadi penghambatan proses biosintesis protein⁵. Menurut Widianingsih (2008) NH_3 yang terlalu banyak dalam medium kultur akan bersifat racun dan mengakibatkan aktivitas sel terhambat dalam proses metabolisme²⁴. Kepadatan sel untuk medium BBM + LCT 1,5% lebih rendah daripada medium BBM + LCT 2,5%, hal ini diduga terjadi karena rendahnya nutrisi yang terdapat dalam medium, walaupun pada kondisi demikian sel-sel mikroalga tetap tumbuh tetapi proses pembelahannya akan terhambat.

Pada kurva dapat dilihat bahwa terjadi fluktuasi kerapatan jumlah sel, hal ini disebabkan oleh perubahan nilai pH pada medium. Perubahan

nilai pH terjadi karena aktivitas persenyawaan nitrogen seperti ammonium (NH_4^+), nitrat (NO_3^-), nitrit (NO_2^-). Sedangkan pada medium BBM pertumbuhan *Scenedesmus* lebih stabil karena medium BBM memiliki unsur hara makro dan mikro dengan perbandingan yang telah distandarkan²².

Biomassa dari masing-masing medium pada saat satu kali panen didalam kultur 500 mL dibandingkan dan didapatkan hasil sebagai berikut:

Tabel 4.1 Bobot biomassa dari medium yang divariasikan

Medium	Berat kering mikroalga (g)
BBM	0,0641
BBM + LCT 1,5 %	0,2116
BBM + LCT 2,5 %	0,2740
BBM + LCT 3 %	0,2314

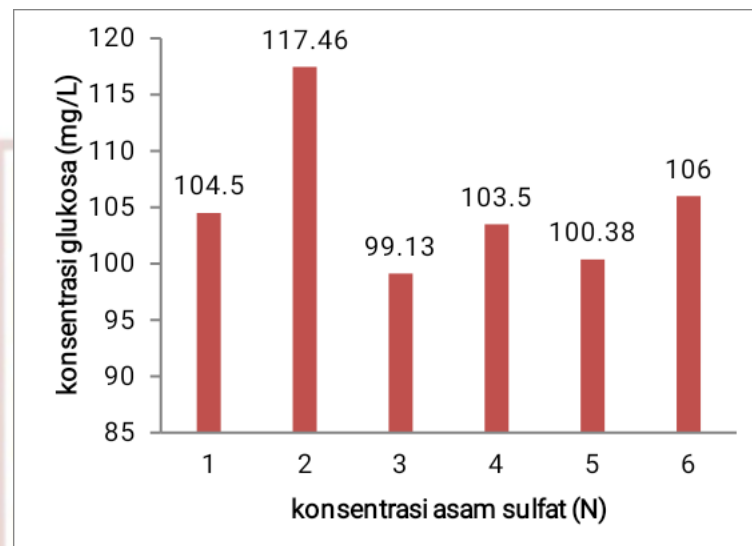
Berdasarkan hasil yang didapatkan, biomassa paling banyak didapatkan dari medium BBM + LCT 2,5% dan biomassa paling sedikit dari medium BBM. Hasil ini berbanding lurus dengan kurva pertumbuhan yang didapatkan, dimana medium yang menghasilkan kurva pertumbuhan tertinggi menandakan kepadatan sel yang lebih besar sehingga jumlah biomassa yang didapatkan lebih banyak.

4.4 Pengaruh Konsentrasi Asam Sulfat terhadap Kadar Glukosa Mikroalga

Biomassa kering mikroalga 0,1 g dihidrolisis dengan beberapa variasi konsentrasi asam sulfat yaitu (1, 2, 3, 4, 5, 6) N dengan suhu 100°C masing-masing selama 15 menit. Kurva hasil hidrolisis dapat dilihat pada gambar 4.3.

Berdasarkan gambar 4.3 dapat dilihat bahwa kadar glukosa hasil hidrolisis dengan menggunakan asam sulfat 2N memberikan hasil yang paling baik. Berdasarkan penelitian Osvaldo (2012) peningkatan hasil glukosa dipengaruhi oleh konsentrasi katalis asam, karena dipengaruhi oleh banyaknya ion H^+ pada asam dapat memutuskan ikatan glikosida yang terdapat pada selulosa²⁵. Sedangkan untuk penggunaan konsentrasi

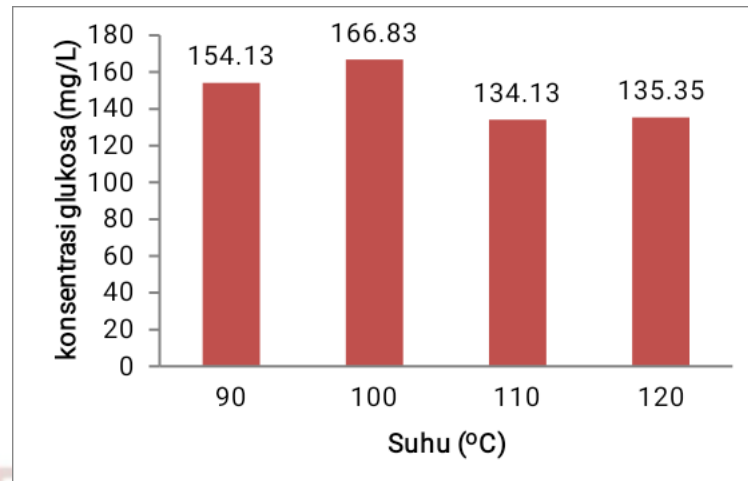
asam sulfat yang lebih dari 2N mengalami penurunan kadar glukosa ini disebabkan karena glukosa yang terbentuk akan terdegradasi lebih lanjut menjadi senyawa turunan glukosa. Beberapa senyawa yang dapat terbentuk selama proses hidrolisis asam encer adalah asetat, asam format, formaldehida, fenol, hidroksimetilfulfural (HMF), dan senyawa lain²³.



Gambar 4.3 Pengaruh konsentrasi asam sulfat terhadap konsentrasi glukosa

4.5 Pengaruh Suhu Hidrolisis terhadap Kadar Glukosa Mikroalga

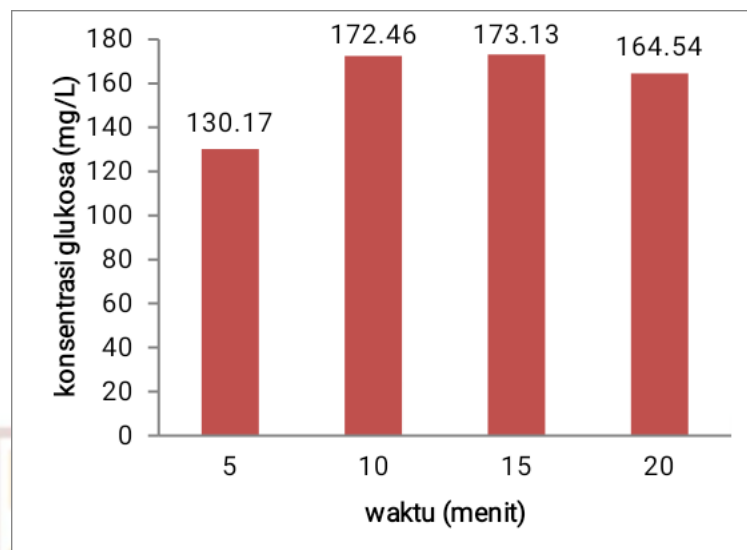
Hidrolisis selulosa dilakukan pada konsentrasi asam 2N dan variasi suhu 90°C, 100 °C, 110 °C, 120°C. Gambar 4.4 menunjukkan bahwa suhu 100°C merupakan suhu optimum hidrolisis mikroalga *Scenedesmus dimorphus* yang dibuktikan dengan tingginya kadar glukosa yang dihasilkan. Wahyudi et al. (2011) menyatakan bahwa proses hidrolisis merupakan reaksi endotermis yang memerlukan panas untuk bereaksi, akan tetapi apabila suhu terlalu tinggi maka katalis akan menguap yang mengakibatkan melambatnya reaksi hidrolisis dan akan berakibat pada konsentrasi glukosa yang diperoleh²⁶.



Gambar 4.4 Pengaruh suhu hidrolisis terhadap konsentrasi glukosa

4.6 Pengaruh Waktu Hidrolisis terhadap Konsentrasi Glukosa Mikroalga

Hidrolisis dilakukan dengan asam sulfat konsentrasi 2N, suhu 100°C, dan variasi waktu hidrolisis yaitu 5 menit, 10 menit, 15 menit, 20 menit. Pada gambar 4.5 dapat dilihat bahwa hidrolisis selama 10 menit dan 15 menit menghasilkan kadar glukosa yang tidak berbeda jauh sehingga untuk efisiensi waktu lebih baik menggunakan waktu hidrolisis 10 menit. Lamanya waktu hidrolisis mempengaruhi kadar glukosa yang dihasilkan ini disebabkan karena semakin lama waktu hidrolisis akan memperpanjang kesempatan asam untuk mendegradasi ikatan rantai lurus dan panjang dari 1,4- beta-glukosa pada selulosa sehingga semakin banyak rantai selulosa dan hemiselulosa yang terurai menjadi glukosa. Namun pada waktu ke 20 menit terjadi penurunan kadar glukosa, hal ini disebabkan karena ion H^+ pada asam telah mencapai titik optimumnya dalam melepaskan ikatan rantai glikosidik pada selulosa²⁷.



Gambar 4.5 Pengaruh waktu hidrolisis terhadap konsentrasi glukosa

4.7 Analisis Kadar Glukosa Mikroalga

Biomassa mikroalga paling banyak didapatkan pada medium dengan penambahan limbah cair tahu 2,5% yang dipanen pada hari ke 30 (fase eksponensial). Biomassa kering dihidrolisis dengan menggunakan asam sulfat 2N selama 15 menit dengan suhu 100°C, kemudian dilakukan pengukuran kadar glukosa dengan menggunakan metode Nelson-Somogy dan didapatkan kadar glukosa mikroalga *Scenedesmus dimorphus* 17,313 mg/gram biomassa dengan efisiensi hidrolisis yaitu 74% (lampiran 8).